



RESEARCH ARTICLE

## UJI TOKSISITAS SUBAKUT DAN ALERGI EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP MENCIT (*Mus musculus L.*)

Setiawan<sup>1</sup>, Hendri Poernomo<sup>2</sup>, Ni Putu Santhi Utami Dewi<sup>3</sup>

Department of Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Universitas Mahasaraswati Denpasar

\*Corresponding email: Ni Putu Santhi Utami Dewi, Email: santhiutami66@gmail.com

### ABSTRAK

**Latar belakang:** Kakao merupakan salah satu tanaman yang dipercaya memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan dan digunakan dalam pengobatan herbal sehingga perlu dilakukan uji keamanan dalam penggunaannya. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kelainan pada histopatologi hepar mencit yang terjadi setelah pemberian sediaan uji secara berulang beserta alergi yang ditimbulkan. **Metode:** Dalam penelitian ini terdapat 25 sampel yang terdiri dari 5 kelompok, yaitu kelompok mencit yang diberikan ekstrak biji kakao dengan dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, 7500 mg/kgBB, dan kelompok kontrol diberi aquades, serta untuk uji alergi diberi gel ekstrak biji kakao 32%. Pemberian sediaan uji secara oral dilakukan setiap hari selama 28 hari, satu kali dalam sehari. Pengamatan meliputi gejala toksik dengan melihat histopatologi organ hepar dan ada atau tidaknya tanda alergi. **Hasil:** Kematian mencit mulai terjadi pada hari pertama setelah pemberian sediaan uji, dengan total 9 ekor mencit mati. Pada hari kedua, 8 ekor mencit mati dengan distribusi dosis yang sama, sedangkan pada hari ketiga, 3 ekor mencit mati. Mencit pada kelompok kontrol yang diberi aquades dapat bertahan hingga hari ke-28. pada mencit menunjukkan bahwa tidak ada gejala alergi yang muncul pada seluruh 8 ekor mencit baik dalam 30, 60, maupun 90 menit setelah pemberian ekstrak biji kakao. **Kesimpulan:** Pemberian ekstrak biji kakao pada dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB berpengaruh terhadap toksisitas subakut dan histopatologi hepar mencit sehingga menyebabkan kematian pada mencit. Ekstrak biji kakao juga tidak menyebabkan alergi (tidak ada ruam dan kemerahan) pada mencit.

**Kata kunci:** Ekstrak biji kakao, histopatologi hepar mencit, uji alergi, uji toksisitas subakut.

### ABSTRACT



**Background:** Cocoa is one of the plants that is believed to have many health benefits and is used in herbal medicine, so it is necessary to conduct safety tests in its use. **Objective:** This study aims to determine abnormalities in the histopathology of the liver of mice that occur after repeated administration of the test preparation along with the allergies caused. **Method:** In this study, there were 25 samples consisting of 5 groups, namely the group of mice given cocoa bean extract at a dose of 4500 mg/kgBW, 5500 mg/kgBW, 6500 mg/kgBW, 7500 mg/kgBW, and the control group was given distilled water, and for allergy testing was given 32% cocoa bean extract gel. Oral administration of the test preparation was carried out every day for 28 days, once a day. Observations included toxic symptoms by looking at the histopathology of the liver and the presence or absence of signs of allergy. **Results:** Death of mice began to occur on the first day after administration of the test preparation, with a total of 9 mice dying. On the second day, 8 mice died with the same dose distribution, while on the third day, 3 mice died. Mice in the control group given distilled water survived until the 28th day. in mice showed that no allergic symptoms appeared in all 8 mice either within 30, 60, or 90 minutes after administration of cocoa bean extract. **Conclusion:** Administration of cocoa bean extract at doses of 4500 mg/kgBW, 5500 mg/kgBW, 6500 mg/kgBW, and 7500 mg/kgBW affected subacute toxicity and liver histopathology of mice, causing death in mice. Cocoa bean extract also did not cause allergies (no rashes and redness) in mice.

**Keywords:** Cocoa bean extract, mouse liver histopathology, allergy test, subacute toxicity test.

## LATAR BELAKANG

Masyarakat di berbagai belahan dunia sering menghadapi tantangan kesehatan, terutama di daerah terpencil dengan keterbatasan akses ke fasilitas medis dan ekonomi. Banyak yang beralih ke pengobatan herbal menggunakan tanaman obat lokal, yang dianggap lebih aman dan alami dibandingkan obat kimia. Indonesia, yang kaya akan tumbuhan obat, juga memanfaatkan tanaman kakao sebagai alternatif pengobatan. Kakao, meskipun terkenal sebagai bahan coklat yang kurang sehat, mengandung senyawa kimia bermanfaat seperti flavonoid, katekin, dan theobromine yang berfungsi sebagai antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi<sup>1</sup>. Penggunaan obat herbal ini penting terutama di tengah biaya kesehatan yang semakin tinggi dan perekonomian yang belum stabil.

Penggunaan biji kakao sebagai obat herbal, meski luas dan umum, masih didasarkan pada bukti empiris tanpa penelitian yang memadai<sup>2</sup>. Untuk memastikan keamanannya, biji kakao perlu menjalani serangkaian uji, termasuk uji khasiat



farmakologi, uji toksisitas, dan uji alergi<sup>3</sup>. Uji toksisitas, khususnya, penting untuk mendeteksi efek toksik dan menentukan dosis aman untuk manusia, sedangkan uji alergi diperlukan untuk mengidentifikasi potensi reaksi hipersensitivitas. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak biji kakao aman digunakan sebagai obat herbal dengan mengidentifikasi dosis dan efek toksik yang mungkin terjadi.

Reaksi alergi terhadap ekstrak biji kakao terjadi ketika sistem kekebalan tubuh menunjukkan sensitivitas terhadap antigen tertentu, dipicu oleh imunoglobulin E (IgE) yang berikatan dengan sel mast<sup>4</sup>. Uji alergi, seperti tes tusuk dan tes tempel, diperlukan untuk mendeteksi potensi reaksi hipersensitivitas. Untuk menilai bahaya toksik bahan tersebut pada manusia, uji toksisitas dilakukan menggunakan hewan uji seperti mencit (*Mus musculus L.*), yang sering dipilih karena siklus hidupnya yang pendek, jumlah keturunan yang banyak, dan kesamaan fisiologi dengan manusia<sup>5</sup>. Penelitian ini penting untuk memastikan keamanan penggunaan ekstrak biji kakao sebagai obat herbal dengan mengidentifikasi potensi efek toksik dan alergi.

Efek toksik obat-obatan sering terlihat pada hepar karena organ ini berperan dalam metabolisme dan detoksifikasi zat asing. Kerusakan hepar, akibat dari hilangnya kemampuan regenerasi sel, dapat menyebabkan kerusakan permanen atau bahkan kematian. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa gel ekstrak biji kakao, dengan konsentrasi 16%, 24%, dan 32%, berpengaruh pada jumlah sel fibroblas dalam penyembuhan luka insisi pada marmut, dengan konsentrasi 32% menunjukkan efektivitas terbaik dalam meningkatkan kepadatan kolagen<sup>6</sup>. Penelitian tambahan juga mengonfirmasi bahwa gel ekstrak biji kakao efektif dalam meningkatkan jumlah sel fibroblast pada soket pasca pencabutan gigi pada tikus wistar jantan, mendukung potensinya sebagai agen penyembuhan luka<sup>7</sup>.

Ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menunjukkan efektivitas dalam penyembuhan luka, dengan konsentrasi 16% terbukti paling efektif dalam meningkatkan jumlah sel fibroblast dan re-epitelialisasi pada soket pasca pencabutan gigi tikus wistar<sup>8</sup>. Gel ekstrak biji kakao dengan konsentrasi 8% dan 16% juga efektif dalam meningkatkan intensitas serabut kolagen pada luka jaringan lunak<sup>9</sup>. Selain itu, ekstrak biji kakao 8% mempercepat penyembuhan luka dengan menurunkan jumlah sel makrofag pada hari



ketiga<sup>10</sup>. Uji toksisitas akut terhadap ekstrak biji kakao pada mencit menunjukkan bahwa dosis 0,65 mg/grBB, 1,3 mg/grBB, dan 2,6 mg/grBB tidak menimbulkan efek toksik atau kematian, mendukung keamanannya sebagai agen terapi<sup>11</sup>.

Penelitian ini akan menguji keamanan ekstrak biji kakao dengan dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB pada mencit melalui uji toksisitas subakut dan uji alergi, memantau histopatologi hepar, tingkah laku, dan respon hipersensitivitas untuk menentukan batas aman penggunaannya.

## **METODE DAN ALAT BAHAN**

Penelitian ini mengadopsi metode kuasi eksperimental laboratorium in vivo dengan desain post-test only control group untuk mengevaluasi keamanan ekstrak biji kakao. Sebanyak 25 mencit jantan atau betina berusia 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram digunakan sebagai sampel, yang dibagi menjadi lima kelompok: empat kelompok perlakuan menerima dosis ekstrak biji kakao berbeda (4500, 5500, 6500, dan 7500 mg/kgBB) dan satu kelompok kontrol diberikan aquadest. Uji toksisitas subakut dilakukan selama 28 hari untuk memantau histopatologi hepar dan perubahan struktural, sedangkan uji alergi dilakukan dengan aplikasi topikal ekstrak konsentrasi 32% pada kulit mencit. Penelitian berlangsung di laboratorium Universitas Udayana dari Agustus hingga Oktober 2022, bertujuan untuk menentukan keamanan dan potensi alergi ekstrak biji kakao.

## **ALAT BAHAN**

Penelitian ini menggunakan berbagai alat dan bahan untuk mendukung prosedur eksperimen dan analisis. Alat yang digunakan meliputi mikroskop, alat gelas, alat bedah, rotary evaporator, dan sentrifuge, bersama dengan peralatan khusus seperti preparat hewan coba dan oral sonde. Bahan yang diperlukan termasuk ekstrak biji kakao 32%, anestesi (ketamin dan xylazine), air suling, etanol 96%, serta hematoksilin-eosin untuk pewarnaan histologi. Mencit jantan atau betina berusia 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram digunakan sebagai subjek penelitian, dilengkapi dengan makanan, minuman, dan kandang untuk memastikan kondisi hewan coba yang optimal selama studi.



## METODE

**Pembuatan Ekstrak Biji Kakao:** Ekstrak biji kakao dibuat dengan mengambil biji kakao matang, membersihkannya dari pulpa, dan mengeringkannya selama 24 jam dengan metode angin-anginan untuk mencegah kerusakan senyawa kimia. Biji yang telah kering kemudian ditumbuk kasar, dihaluskan dengan blender, dan direndam dalam etanol 96% selama 24 jam dengan metode meserasi. Ekstrak yang dihasilkan disaring dan dipadatkan menggunakan rotary evaporator selama 2 jam untuk memisahkan pelarut dari ekstrak, menghasilkan ekstrak pekat biji kakao.

**Uji Fitokimia:** Uji fitokimia dilakukan untuk menentukan kandungan zat aktif dalam ekstrak biji kakao, termasuk flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, steroid atau triterpenoid, dan kuinon. Metode uji melibatkan reaksi kimia dengan reagen spesifik, seperti Pb asetat untuk flavonoid,  $\text{FeCl}_3$  untuk tannin, metode Foth untuk saponin, pereaksi Dragendorff dan Mayer untuk alkaloid, serta pereaksi Liebermann-Burchard untuk steroid atau triterpenoid. Hasil uji ditandai dengan perubahan warna atau terbentuknya endapan.

**Uji Spektrofotometri Kadar Flavonoid Total:** Spektrofotometri digunakan untuk mengukur kadar flavonoid total dalam ekstrak biji kakao. Prosedur melibatkan pembuatan larutan natrium asetat dan  $\text{AlCl}_3$ , serta kurva kalibrasi dengan kuersetin sebagai standar. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang maksimum 431 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil absorbansi dibandingkan dengan kurva kalibrasi untuk menghitung kadar flavonoid total dalam ekstrak biji kakao.

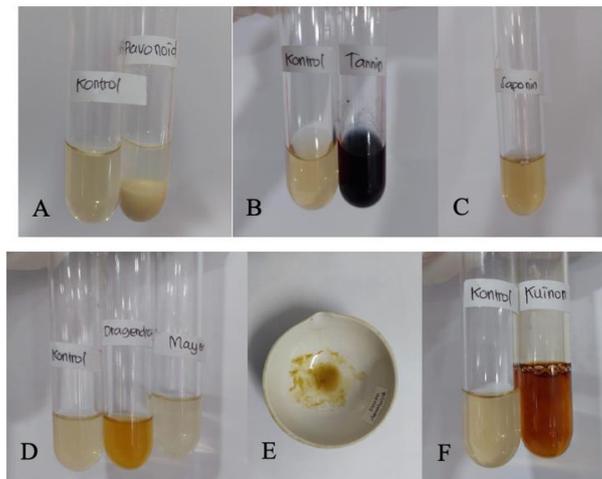
**Pengujian Toksisitas dan Alergi:** Pengujian toksisitas sub-akut melibatkan pemberian ekstrak biji kakao secara oral kepada kelompok mencit dengan dosis berbeda selama 28 hari, diikuti dengan pemeriksaan histopatologi hepar untuk mengidentifikasi efek toksik. Uji alergi dilakukan dengan mengoleskan ekstrak biji kakao secara topikal pada mencit dan mengamati tanda-tanda alergi seperti ruam atau kemerahan pada interval waktu tertentu. Data dari penelitian dianalisis secara statistik menggunakan analisis deskriptif, uji normalitas, homogenitas, serta uji One Way Anova atau uji Kruskal-Wallis jika diperlukan.

## HASIL PENELITIAN

Penelitian ini melibatkan 25 ekor mencit betina yang dibagi menjadi lima kelompok, masing-masing menerima dosis ekstrak biji kakao berbeda (4500, 5500, 6500, dan 7500 mg/kg BB) secara oral selama 28 hari, dengan kelompok kontrol menerima aquades. Mencit yang mati selama periode pengujian diotopsi untuk analisis histopatologi hepar guna mendeteksi kerusakan organ. Selain itu, uji alergi dilakukan dengan mengoleskan ekstrak biji kakao 32% pada punggung mencit dan memantau reaksi alergi. Penelitian ini juga mencakup uji fitokimia untuk menentukan kandungan zat aktif, uji spektrofotometri untuk mengukur kadar flavonoid total, uji pendahuluan, dan analisis data statistik untuk mengevaluasi hasil uji toksisitas subakut serta potensi alergi dari ekstrak biji kakao.

Tabel 1. Hasil Uji Skrining Fitokimia

No.	Senyawa	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
1.	Flavonoid	Pb asetat dan amil alcohol	Terbentuk endapan berwarna kuning	Positif
2.	Tanin	FeCl <sub>3</sub> 3%	Tidak terbentuk warna hijau kehitaman	Negatif
3.	Saponin	Aquades	Tidak terbentuk busa	Negatif
4.	Alkaloid	<i>Dragendorff</i> dan <i>Mayer</i>	Tidak terbentuk endapan jingga dan putih	Negatif
5.	Steroid /Triterpenoid	<i>Liebermann</i> <i>Burchard</i>	Tidak terbentuk warna merah jingga atau ungu	Negatif
6	Kuinon	NaOH 1N	Terbentuk larutan berwarna merah	Positif



Gambar 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak biji kakao. (A) Flavonoid, (B) Tanin, (C) Saponin, (D) Alkaloid, (E) Steroid/triterpenoid, (F) Kuinon

Uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan zat aktif dalam biji kakao secara kualitatif, mencakup flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, steroid atau triterpenoid, dan kuinon. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao mengandung flavonoid dan kuinon, yang terindikasi dengan adanya endapan putih kekuningan pada pengujian flavonoid dan larutan merah kecokelatan pada pengujian kuinon, seperti yang dijelaskan dalam tabel 1.

Spektrofotometri adalah sebuah metode dalam analisis kimia yang berguna untuk menentukan konsentrasi suatu larutan melalui intensitas serapan pada panjang gelombang tertentu secara kuantitatif. Hasil uji spektrofotometri kadar flavonoid total ekstrak biji kakao dalam penelitian ini yaitu 82,100 mgQE/100g atau 8,21%/100g ekstrak biji kakao.

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan dosis awal yang akan digunakan dalam uji utama. Uji pendahuluan menggunakan satu hewan uji pada tiap dosis. Dosis yang digunakan dalam uji pendahuluan ini yaitu 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12.800 mg/kgBB. Hasil uji pendahuluan disajikan dalam tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Kematian Mencit Pada Uji Pendahuluan



Kelompok	Jumlah Mencit	Dosis (mg/kgBB)	Jumlah Kematian
I	1	400	0
II	1	800	0
III	1	1600	0
IV	1	3200	0
V	1	6400	1
VI	1	12.800	1

Pada tabel di atas dapat diamati bahwa hasil uji pendahuluan pada dosis 400, 800, 1600, dan 3200 mg/kg BB tidak menimbulkan kematian pada mencit, pada dosis 6400 mg/kg BB terdapat kematian sebanyak 1 ekor mencit, dan pada dosis 12.800 mg/kg BB terdapat kematian sebanyak 1 ekor mencit.

Penelitian ini menggunakan 25 sampel hepar mencit dalam pengujian toksisitas subakut. Data yang terkumpul merupakan data kematian mencit akibat pemberian sediaan uji (Tabel 3) dan rerata skor kerusakan hepar mencit dalam setiap kelompok perlakuan (Tabel 4). Untuk uji alergi menggunakan 8 ekor mencit. Data yang terkumpul merupakan data reaksi yang terjadi setelah pemberian sediaan uji secara topikal pada mencit.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Jumlah Kematian Mencit

Kelompok	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Jumlah Kematian
				Mencit
Kontrol	-	-	-	0
P1 4500 mg/kgBB	1	2	2	5
P2 5500 mg/kgBB	1	3	1	5
P3 6500 mg/kgBB	3	2	-	5
P4 7500 mg/kgBB	4	1	-	5

Berdasarkan tabel 3, kematian mencit mulai terjadi pada hari pertama setelah pemberian sediaan uji, dengan total 9 ekor mencit mati, yang terbagi pada berbagai dosis:



1 ekor pada dosis 4500 mg/kgBB, 1 ekor pada dosis 5500 mg/kgBB, 3 ekor pada dosis 6500 mg/kgBB, dan 4 ekor pada dosis 7500 mg/kgBB. Pada hari kedua, 8 ekor mencit mati dengan distribusi dosis yang sama, sedangkan pada hari ketiga, 3 ekor mencit mati, yaitu 2 ekor pada dosis 4500 mg/kgBB dan 1 ekor pada dosis 5500 mg/kgBB. Mencit pada kelompok kontrol yang diberi aquades dapat bertahan hingga hari ke-28.

Tabel 4. Analisis Deskriptif Uji Toksisitas Subakut

Kelompok	Mean	N	Std. Deviation
K	1,2	5	0,45
P <sub>1</sub>	1,4	5	0,55
P <sub>2</sub>	1,8	5	0,45
P <sub>3</sub>	2,2	5	0,45
P <sub>4</sub>	3,6	5	0,55

Uji statistik deskriptif menunjukkan bahwa kelompok P4 memiliki rerata tertinggi dan kelompok P1 serta P4 memiliki deviasi standar tertinggi, menandakan varians data yang lebih besar. Uji normalitas dengan Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki p-value < 0,05, sehingga data tidak terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas dengan Levene's Test menunjukkan p-value 0,539, mengindikasikan varian data antar kelompok homogen. Dengan asumsi normalitas yang tidak terpenuhi, uji Kruskal-Wallis dilakukan, menunjukkan p-value 0,001, menandakan adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan. Uji Mann-Whitney, yang membandingkan pasangan kelompok, menemukan perbedaan signifikan antara beberapa kelompok, termasuk K dan P4, serta P1 dan P3, menunjukkan bahwa dosis ekstrak biji kakao mempengaruhi toksisitas subakut pada hepar mencit.

Tabel 6. Analisis Deskriptif Alergi Mencit



Alergi	Waktu	Frekuensi	Proporsi
0 (Tidak Ada)	30 Menit	8	100%
	60 Menit	8	100%
	90 Menit	8	100%

Analisis deskriptif alergi pada mencit menunjukkan bahwa tidak ada gejala alergi yang muncul pada seluruh 8 ekor mencit baik dalam 30, 60, maupun 90 menit setelah pemberian ekstrak biji kakao, dengan proporsi 100% untuk semua waktu pengamatan. Uji Wilcoxon antara menit ke-30 dan menit ke-60 serta antara menit ke-60 dan menit ke-90 menunjukkan nilai Z sebesar 0,0001 dan nilai signifikansi masing-masing 1, yang berarti tidak terdapat perbedaan signifikan dalam hasil uji alergi. Kesimpulannya, pemberian ekstrak biji kakao secara topikal tidak menyebabkan efek alergi pada mencit dalam periode waktu yang diuji.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini mengamati angka kematian mencit, skor kerusakan hepar, dan hasil uji alergi setelah pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis bertingkat pada mencit yang diaklimatisasi selama seminggu untuk menghilangkan stres akibat transportasi dan menyesuaikan dengan lingkungan laboratorium. Mencit berusia 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram dikelompokkan dalam lima kelompok dosis berbeda, masing-masing terdiri dari 5 ekor, serta satu kelompok uji alergi dengan 8 ekor mencit. Biji kakao, yang kaya senyawa polifenol antioksidan, diperoleh dari kebun di Kabupaten Jembrana, dicuci, diangin-anginkan, dan dihaluskan menjadi bubuk sebelum digunakan.

Penelitian ini melibatkan proses ekstraksi biji kakao melalui pembuatan bubuk, pembasahan, penyarian dengan maserasi, dan pemekatan untuk menarik kandungan kimianya. Uji skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa aktif seperti flavonoid dan kuinon, meskipun tidak ditemukan senyawa alkaloid, tanin, saponin, dan triterpenoid yang dilaporkan oleh penelitian sebelumnya. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh faktor geografis, jenis kakao, perawatan tanaman, dan metode uji fitokimia. Flavonoid, yang merupakan metabolit sekunder dari polifenol, dikenal memiliki berbagai manfaat biologis



seperti anti-virus, anti-inflamasi, dan antioksidan<sup>12</sup>. Uji flavonoid menggunakan larutan Pb asetat 10% menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan kuning.

Kuinon, sebagai turunan senyawa fenol, memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antijamur, antimalaria, antibakteri, antikanker, dan antioksidan<sup>13</sup>. Kuinon memiliki kromofor dasar dengan dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon, menghasilkan warna dari kuning pucat hingga kehitaman. Kuinon terbagi menjadi benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid, dan lebih mudah larut dalam lemak<sup>14</sup>. Uji fitokimia pada ekstrak biji kakao dengan pelarut NaOH 1N menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya larutan kuning kemerahan. Penelitian juga melibatkan uji pendahuluan toksisitas untuk menentukan dosis yang tepat, dengan kelompok mencit diberi dosis 400 hingga 12.800 mg/kg BB. Hasil uji menunjukkan kematian mencit pada dosis 6.400 mg/kg BB dan 12.800 mg/kg BB, menentukan dosis toksisitas utama yang dapat membunuh separuh hewan uji.

Dalam penelitian ini, dosis untuk uji toksisitas utama dipilih berdasarkan hasil uji pendahuluan yang menunjukkan kematian mencit pada dosis 6400 mg/kg BB dan 12800 mg/kg BB. Uji utama menggunakan dosis 4500 mg/kg BB, 5500 mg/kg BB, 6500 mg/kg BB, dan 7500 mg/kg BB untuk menentukan dosis aman dan melihat efek kerusakan hepar pada mencit yang diberi dosis tinggi secara berulang. Mencit yang telah diaklimatisasi diberi bahan uji secara oral selama 28 hari untuk uji toksisitas sub-akut dan secara topikal untuk uji alergi. Uji toksisitas sub-akut dilakukan untuk mengetahui efek paparan berulang zat tertentu pada organ sasaran, yaitu hepar, yang terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan. Meskipun hepar memiliki kemampuan metabolisme untuk mengurangi toksisitas, eksposur berulang pada dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan organ<sup>15</sup>.

Penelitian ini mengevaluasi efek toksisitas ekstrak biji kakao pada mencit dengan dosis bertingkat. Mencit diaklimatisasi selama seminggu sebelum diberi perlakuan oral dengan dosis 4500 mg/kg BB, 5500 mg/kg BB, 6500 mg/kg BB, dan 7500 mg/kg BB selama 28 hari, serta uji alergi topikal. Pengamatan menunjukkan kematian mencit pada dosis tinggi dan kerusakan hepar berupa degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik, dan nekrosis, dengan degenerasi parenkim sebagai yang paling ringan dan reversibel.



Degenerasi hidropik lebih berat dan bisa menjadi irreversibel, sedangkan nekrosis bersifat irreversibel dan dapat menyebabkan kematian sel<sup>16</sup>. Sel hepar yang terus terpapar toksikan dapat mengalami perubahan yang signifikan, termasuk kematian sel yang disebabkan oleh apoptosis atau nekrosis<sup>17</sup>.

Hasilnya menunjukkan bahwa dosis tinggi menyebabkan kematian mencit dengan cepat dan kerusakan hepar yang parah. Mencit yang diberi dosis 4500 mg/kgBB bertahan selama 3 hari dengan kondisi hepar cenderung normal dan degenerasi parenkimatososa. Pada dosis 5500 mg/kgBB dan 6500 mg/kgBB, mencit juga hanya bertahan 2-3 hari dengan degenerasi parenkimatososa. Pada dosis tertinggi 7500 mg/kgBB, mencit mengalami degenerasi hidropik dan nekrosis serta mati dalam 2 hari. Kematian cepat ini kemungkinan disebabkan oleh dosis tinggi yang merusak sel hepar, kondisi mencit yang mungkin sudah mengalami kerusakan sebelumnya, atau faktor lain seperti stres dan daya tahan tubuh mencit. Pada kelompok kontrol yang diberi akuades, mencit bertahan hingga 28 hari tanpa kerusakan hepar.

Penelitian ini menunjukkan bahwa dosis tinggi mempercepat kerusakan sel hepar dan kematian mencit. Kandungan flavonoid dalam biji kakao memiliki sifat antifungi yang dapat merusak membran sel, sementara kuinon dapat menyebabkan kesulitan bernapas dan peradangan pada dosis tinggi<sup>18</sup>. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan data tidak berdistribusi normal, sedangkan uji homogenitas menggunakan *Levene test* menunjukkan data homogen. Uji *Kruskal Wallis* menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada skor kerusakan hepar di antara kelompok dosis. Uji *Mann Whitney* menegaskan perbedaan signifikan antar kelompok dosis.

Hasil uji alergi menunjukkan bahwa tidak terjadi tanda-tanda alergi pada mencit seperti gatal-gatal, kemerahan, dan radang (skor-0). Hasil pengujian dengan *Wilcoxon* menampilkan hasil uji alergi yang diukur pada menit ke-30 hingga menit ke-90. Hasil uji statistik diperoleh bahwa tidak ada reaksi alergi pada mencit selama periode uji dengan nilai  $p = 1,000 > 0,05$ . Salah satu faktor yang menyebabkan tidak adanya reaksi alergi pada mencit yaitu berasal dari flavonoid yang terkandung pada biji kakao. Hal ini disebabkan karena flavonoid memiliki komponen anti-inflamasi yang dapat membantu dalam pengobatan untuk mengatasi masalah alergi.

Dari hasil penelitian di atas dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada uji toksisitas subakut selama 28 hari memiliki resiko toksik terhadap



mencit (*Mus musculus*) dan berpengaruh terhadap toksisitas subakut yang terjadi pada hepar mencit. Sedangkan pada uji alergi tidak menunjukkan adanya tanda-tanda alergi seperti ruam, kemerahan, dan gatal.

## SIMPULAN

Pemberian ekstrak biji kakao pada dosis 4500 mg/kgBB, 5500 mg/kgBB, 6500 mg/kgBB, dan 7500 mg/kgBB berpengaruh terhadap toksisitas subakut dan histopatologi hepar mencit sehingga menyebabkan kematian pada mencit. Ekstrak biji kakao juga tidak menyebabkan alergi (tidak ada ruam dan kemerahan) pada mencit.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ardian P. Analisa Ekstraktif Tumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat. Pusat Penelitian Universitas Negeri Andalas; 2015.
2. Putri HE. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) Terhadap Gambaran Morfologi dan Histologi Hati Mencit (*Mus musculus*) Jantan. Bachelor's thesis, Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar; 2016.
3. Sastyarina Y. Uji Toksisitas Akut Dan Subakut Pada Pemberian Ekstrak Etanol Bawang Tiwai (*Eleutherine Americana* Merr.). *J Trop Pharm Chem.* 2013;2(2):118-24.
4. Novianto F. Pengaruh Formula Jamu Anti-Alergi terhadap Kualitas Hidup Pasien Rinitis Alergi di Klinik Hortus Medicus Tawangmangu. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.* 2021;19(1):25-9.
5. Mutiarahmi CN, Hartady T, Lesmana R. Kajian Pustaka: Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba di Laboratorium yang Mengacu pada Prinsip Kesejahteraan Hewan. *Medicus Veterinus Indonesia.* 2021;10(1):134-45.
6. Dianti PPP. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblas Pada Penyembuhan Luka Insisi Gingiva Marmut Jantan (*Cavia percellus*). Denpasar: Universitas Mahasaraswati; 2020.



7. Al-Fa'izah Z. Efektivitas Gel Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Jumlah Sel Fibroblast Pada Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar Jantan. Jember: Universitas Jember; 2018.
8. Ali MF. Efek Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Re-Epitelialisasi Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar. Jember: Universitas Jember; 2018.
9. Farhatika N. Efektivitas Gel Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Intensitas Kolagen Pada Penyembuhan Luka Jaringan Lunak Soket Pasca Pencabutan Gigi Tikus Wistar. Jember: Universitas Jember; 2018.
10. Kurniawati A, Cholid Z, Pertiwi MH. Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Terhadap Penyembuhan Luka Pencabutan Gigi Pada Sel Makrofag. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi*. 2019;13(2).
11. Suardita IW, Mufida DC, Misnawi. Efek Imunomodulasi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit yang Diinfeksi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa. Available from: <http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/59369/I%20Waya> [Accessed 20 April 2022].
12. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas dan antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. 2018;6(1):21-29.
13. Mutrikah, Santoso H, Syauqi A. Profil Bioaktif pada Tanaman Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) dan Beluntas (*Pluchea indica* Less). *Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*. 2018;4(1):15-21.
14. Noer S, Pratiwi RD. Uji Kualitatif Fitokimia Daun *Ruta Angustifolia*. *Faktor Exacta*. 2016;9(3):200-6.
15. Huda MN, Holidah D, Fajrin FA. Uji Toksisitas Subkronik Jamu Asam Urat pada Hati Mencit Galur Balb-C. *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2017;5(1):65-70.
16. Utomo Y, Hidayat A, Dafip M, Sasi FA. Studi Histopatologi Hati Mencit (*Mus musculus* L.) Yang Diinduksi Pemanis Buatan. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences*. 2012;35(2):126-7.



17. Oktarian A, Budiman H, Aliza D. Histopatologi Hati Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinjeksi Formalin. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*. 2017;1(3):316-23.
18. Kumalasari E, Sulistyani N. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Candida albicans* Serta Skrining Fitokimia. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 2011;1(2):60.